



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* y
Staphylococcus aureus aislados de piodermias caninas
mediante PCR-RFLP**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Guillermo ALVAREZ VEGA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Alvarez L. Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* aislados de piodermias caninas mediante PCR-RFLP [Tesis Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019].



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones
Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central
" Año de la universalización de la salud"



Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor:
<https://orcid.org/0000-0001-8927-3598>

Código ORCID del asesor:
orcid.org/0000-0003-4955-2378

DNI del autor:
71419745

Grupo de investigación:
Microbiología Aplicada a la Salud Pública-Animal y de Impacto Ambiental (MASPAIA)

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:
Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima – Perú (-12.080729, -76.987032)

Año o rango de años que la investigación abarcó:
2018-2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 28 de noviembre de 2019**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0205-EPMV/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

Dr. Blgo. Abelardo Lenin Maturrano Hernández	Presidente del Jurado
Blg. Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza	Asesora de la Tesis
MV. Esp. Viviana Rosa Fernández Paredes	Miembro del Jurado
MV. Mg. Juan José Siuce Moreno	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **ALVAREZ VEGA, LUIS GUILLERMO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“DETECCIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE PIODERMIAS CANINAS MEDIANTE PCR-RFLP”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECINUEVE (19)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:11 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Abelardo Lenin Maturrano Hernández: Dr. Blgo. Prof. Principal. D.E

Sonia Yenny Calle Espinoza: MV. Mg. Prof. Principal. D.E

Viviana Rosa Fernández Paredes: MV. Esp. Prof. Asociado. T.C

Juan José Siuce Moreno: MV. Mg. Prof. Auxiliar. D.E



A mis padres, hermanos y abuelas, quienes
siempre me brindaron su apoyo durante
cada una de las etapas de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Calle por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis bajo su asesoría y estar al pendiente para que esta se desarrolle de la mejor manera.

A los doctores Juan Siuce y Miguel Rojas, quienes me ayudaron y aconsejaron durante el desarrollo de la metodología de este estudio.

A André Sedano, quien inicialmente me ayudó en la formulación y planteamiento del proyecto; además me brindó su amistad y me compartió sus conocimientos que pude poner en práctica durante este tiempo.

A mis amigos del laboratorio de Bacteriología: Joel, Sofi, Brayan, Fernando y Freshia por la ayuda que me brindaron durante el desarrollo de este estudio.

A mis amigos de la carrera Carla, Jonathan, Pamela y Grecia, quienes me acompañaron en este largo trayecto y siempre me apoyaron de alguna u otra manera.

El presente estudio fue financiado por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM.



VICERRECTORADO DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Índice del Contenido

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Generalidades	5
2.1.1. Piodermia canina	5
2.1.2. Género <i>Staphylococcus</i>	8
2.1.2.1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	11
2.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.1.2.3. Resistencia antimicrobiana	12
2.1.2.4. Factores de virulencia.....	13
2.2. Identificación fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> y estafilococos del grupo de los intermedius (SIG).....	14
2.2.1. Medios de cultivo	14
2.2.2. Tinción Gram.....	17
2.2.3. Catalasa, oxidasa y coagulasa	17
2.3. Identificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	19
2.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	19
2.3.2. PCR-RFLP y gen <i>pta</i>	21
2.4. Importancia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en salud pública.....	22
III MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración.....	25
3.2. Descripción del material experimental	25
3.3. Materiales y Equipos.....	25
3.4. Reactivos	26
3.5. Metodología	27
3.5.1. Reactivación de aislados.....	27

3.5.2.	Extracción de ADN.....	27
3.5.3.	Reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	28
3.5.4.	Electroforesis	29
3.5.5.	Secuenciamiento para la validación de los productos identificados como <i>S. pseudintermedius</i>	30
IV	RESULTADOS.....	31
V	DISCUSIÓN	35
VI	CONCLUSIONES.....	40
VII	LITERATURA CITADA.....	41
	ANEXOS.....	55
	ANEXO 1	56
	Reactivación y extracción de ADN	56
	ANEXO 2	59
	Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2016.....	59
	ANEXO 3	60
	Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2017.....	60
	ANEXO 4	61
	Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2018.....	61

RESUMEN

A nivel mundial la piodermia es una de las enfermedades de la piel más diagnosticada en caninos. Entre los agentes involucrados se encontraba *Staphylococcus intermedius*, el que se creía el principal agente de las piodermias caninas; sin embargo, en el año 2005 fue reclasificado en 3 especies: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*. Posteriormente, estudios en diferentes países reportaron que el *Staphylococcus pseudintermedius* es en realidad el agente bacteriano más frecuentemente aislado en piodermias, seguidamente surgieron los primeros reportes de aislados resistentes a meticilina. Por otro lado, *Staphylococcus aureus*, patógeno importante en medicina humana, se aísla con más frecuencia en muestras de piodermias caninas, siendo estos potenciales reservorios para reinfecciones en humanos de cepas resistentes a antibióticos. Por ello, este estudio buscó determinar la presencia *S. pseudintermedius* y *S. aureus* en 141 aislados de *Staphylococcus* sp. provenientes de casos de piodermia canina del periodo 2016 - 2018. El ADN de los 141 aislados fue extraído y analizado mediante PCR-RFLP, el cual consistió en la amplificación del gen *pta* y la digestión con la enzima MboI. Obteniendo que los aislados de *Staphylococcus* sp. fueron identificados como *Staphylococcus pseudintermedius* en un 87.9%, 12.1% como otros *Staphylococcus* sp. y no se detectó *Staphylococcus aureus*. Concluyéndose que el *Staphylococcus* más frecuentemente involucrado en piodermias caninas es el *Staphylococcus pseudintermedius*; sin embargo, no se debe omitir el rol potencial que puede cumplir *Staphylococcus aureus* como patógeno en caninos.

Palabras claves: Piodermia, caninos, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, PCR-RFLP

ABSTRACT

Worldwide, pyoderma is one of the most diagnosed skin diseases in dogs. Among the agents involved was *Staphylococcus intermedius*, which was believed to be the main agent of canine pyodermias; however, in 2005 it was reclassified into 3 species: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. delphini*. Subsequently, studies in different countries reported that *Staphylococcus pseudintermedius* is actually the most frequently isolated bacterial agent in pyoderma, followed by the first reports of methicillin-resistant isolates. On the other hand, both *Staphylococcus aureus*, an important pathogen in human medicine, and *S. pseudintermedius* is more frequently isolated in samples of canine pyodermias, these potential reservoirs being for reinfections in humans of antibiotic strains. Therefore, this study sought to detect the presence of *S. pseudintermedius* and *S. aureus* in 141 isolates of *Staphylococcus* sp. from cases of canine pyoderma of the 2016-2018 period. The DNA of the 141 isolates was extracted and analyzed by PCR-RFLP, which consists of the amplification of the *pta* gene and digestion with the MboI enzyme. Getting the isolates of *Staphylococcus* sp. were identified as *Staphylococcus pseudintermedius* in 87.9%, 12.1% as other *Staphylococcus* sp. and *Staphylococcus aureus* was not detected. Concluding that the *Staphylococcus* most frequently involved in canine pyoderma is *Staphylococcus pseudintermedius*; however, the potential role that *Staphylococcus aureus* can play as a pathogen in canines should not be omitted.

Keywords: Pyoderma, dogs, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, PCR-RFLP.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Secuencia de cebadores para el gen <i>pta</i>	pág.28
Cuadro 2.	Resultados de la identificación por PCR - RFLP de los 141 aislados identificados bioquímicamente como <i>Staphylococcus</i> sp. de piodermias caninas según año de aislamiento	pág. 33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Erupción papular en el abdomen de un perro alérgico causada por <i>Staphylococcus</i> sp. multirresistente.....	pág. 7
Figura 2.	Piodermia Superficial. Collaretes epidérmicos típicos en un perro con pioderma.....	pág. 7
Figura 3.	Inferencia de la filogenia estafilocócica utilizando la metodología de estimación bayesiana de árboles de especies (BEST) en base al ARNr 16S	pág. 10
Figura 4.	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> en agar sangre de oveja.....	pág. 15
Figura 5.	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> en sal de manitol agar.....	pág.16
Figura 6.	Prueba de coagulasa en tubo	pág. 19
Figura 7.	Gel de electroforesis de los productos de <i>pta</i> digeridos con la enzima MboI	pág. 31
Figura 8.	Alineamiento de las secuencias del gen <i>pta</i> de los aislados S29 y S60 con la cepa HKU10-03 NC_014925.1).....	pág. 32
Figura 9.	Frecuencia de aislamiento de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> y otros <i>Staphylococcus</i> (No <i>S. aureus</i>) por año.....	pág. 33

I INTRODUCCIÓN

La piodermia se define como una infección bacteriana piogénica de la piel (Gross *et al.*, 2005; Senturk *et al.*, 2005). Son producidas por el desequilibrio de la población microbiana cutánea debido a la multiplicación de bacterias en la dermis o en la epidermis (Ihrke, 1996). En diversas partes del mundo, la piodermia es una de las enfermedades de la piel más diagnosticada en caninos debido a que la piel canina posee ciertas características como un estrato córneo delgado y compacto, pH relativamente elevado y ausencia de un tapón epitelio escamoso de lípidos en la apertura de los folículos que la hacen propensa a padecer estos problemas (Ihrke, 1996; Gortel, 2013).

Una gran variedad de agentes bacterianos puede aislarse de piodermias en caninos, entre ellos *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Escherichia coli* (Senturk *et al.*, 2005; Fogel y Manzuc, 2009). Sin embargo, la mayoría son causadas por *Staphylococcus* spp., como lo demuestra los diferentes estudios realizado en América, como en Colombia donde se reporta 86% (Castellanos *et al.*, 2011), en Costa Rica 88% (Romero, 2014) y en Perú 78,3% (Antúnez *et al.*, 2009). En general se indican frecuencias de aislamiento entre 72 a 92% (Noli *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2001; Cavalcanti y Coutinho, 2005).

Por mucho tiempo se reconoció que dentro de las especies del género *Staphylococcus* más frecuentes en piodermias caninas se encontraban *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. schleiferi* (May *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2009). Sin embargo, en el año 2005, el *Staphylococcus intermedius*, reconocido como el agente causal de la mayoría de

las piodermias caninas, fue reclasificado en tres especies similares fenotípicamente agrupados dentro del Grupo de los *Staphylococcus intermedius* (SIG): *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini delphini* (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007).

Además, Fitzgerald (2009) reportó que el *S. pseudintermedius* era la bacteria más frecuentemente aislado en piodermias caninas y no el *S. intermedius*, como antes se creía, así mismo Wang *et al.* (2012) determinó una frecuencia de 92% de *S. pseudintermedius* de los casos clínicos de pioderma canina por estafilococos en China. Por otro lado, Onuma *et al.* (2011) halló una frecuencia de 76 % de *S. pseudintermedius* en caninos de Japón.

Se ha evidenciado la transmisión de *Staphylococcus pseudintermedius* entre humanos y perros que han estado en contacto, notándose un aumento en la frecuencia de estos casos (Boost *et al.*, 2008, Hanselman *et al.*, 2009). Se ha reportado casos de infecciones clínicas por *Staphylococcus pseudintermedius* en humanos, tales como bacteriemia (Vandenesch *et al.*, 1995), absceso cerebral (Atalay *et al.*, 2005), neumonía (Gerstadt *et al.*, 1999), heridas quirúrgicas (Lee, 1994) y hasta un marcapaso cardíaco infectado (Van Hoovels *et al.*, 2006; Riegel *et al.*, 2011). Este tipo de cepas es de importancia en la salud pública; ya que, sin formar parte de la microbiota habitual, como si es el caso de *Staphylococcus aureus*, está siendo reportado en casos clínicos humanos (Kluytmans y Wertheim, 2005; Bustos *et al.*, 2006). Además, las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina (SPRM) son aisladas de diversas lesiones en humanos, pudiendo convertirse en un microorganismo residente capaz de ser transmitido a otras personas (Guardabassi *et al.*, 2004; Riegel *et al.*, 2011).

De igual manera, el contacto estrecho entre las mascotas ha hecho posible que cepas de *S. aureus* sean aisladas de animales, representando de esta manera patógenos de importancia en medicina veterinaria (Devriese, 1990). En consecuencia, en los últimos años se reporta la presencia de *S. aureus* en hisopados de piel de perros, tal como lo demuestra Katakweba *et al.* (2016) quien halló en Tanzania 11% *S. aureus* (11/100), de igual forma en Zambia se encontró el 13.6% de *S. aureus* (Jung-Ho *et al.*, 2014) y en Corea del Sur 8.1% de *S. aureus* del total de aislados (Moon *et al.*, 2012).

Por su parte, la resistencia a meticilina de *S. aureus* (SARM) es reportado desde hace más de 50 años en medicina humana (Lyon y Skurray, 1987). En medicina veterinaria, se han notificado casos de infecciones por SARM en perros (Gortel *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 1999; Tomlin *et al.*, 1999). Además, existen estudios que han demostrado que las clonas de SARM que circulan en animales domésticos, como el perro, son similares a los identificados en humanos y pertenecen principalmente a clones adquiridos en hospitales (Loeffler y Lloyd, 2010). Por tanto, la epidemiología sugiere que los humanos pueden ser la fuente de SARM aislado en perros, y luego los perros actuar como reservorio capaz de causar reinfecciones humanas en contextos específicos (Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016).

Bioquímicamente, Sasaki *et al.* (2007) intentó diferenciar al *S. pseudintermedius* de las otras especies del SIG, no logrando identificar marcadores fenotípicos para diferenciar al *S. pseudintermedius* la especie de mayor relevancia clínica en caninos. Hasta en esos años la identificación precisa de *S. pseudintermedius* se basaba en la secuenciación genética. (Sasaki *et al.*, 2007; Bannoehr *et al.*, 2007). Sin embargo, Bannoehr *et al.* (2009) elaboró un método de reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) amplificando el

gen *pta*; logrando así, diferenciar al *S. pseudintermedius* y *S. aureus* de otras especies del género.

En muchos laboratorios las especies de *Staphylococcus* no son identificadas precisamente y los cultivos aislados se consideran solo como *Staphylococcus* sp. Sin embargo, a la luz de las cepas SARM y SPRM y del papel de reservorio que pueden cumplir los caninos domésticos, permitiendo una posible transmisión de tales microorganismos a humanos, la identificación precisa del *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de animales resulta cada vez más importante (Ralf, 2008; Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016). Por ello, el propósito del presente estudio es detectar *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* aislados de piodermias caninas mediante PCR-RFLP de muestras aisladas durante los años 2016-2018 en el Laboratorio de microbiología y parasitología, sección bacteriología y micología de la FMV - UNMSM.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades

2.1.1. Piodermia canina

La piodermia, una infección bacteriana cutánea piógena, es una de las enfermedades cutáneas más comunes de los perros (Hnilica y Patterson, 2017). El *Staphylococcus pseudintermedius* al ser el residente más frecuentemente aislado de piel en caninos está asociado a infecciones cutáneas secundarias. Estas infecciones secundarias se caracterizan por la recidiva, la cual es la consecuencia de un proceso patológico previo que permite que *S. pseudintermedius* se convierta en un oportunista e invada el estrato córneo o el folículo piloso (Ettinger y Feldman, 2007; Hnilica y Patterson, 2017). Los procesos patológicos previos o subyacentes pueden alterar la piel directamente como consecuencia de un traumatismo, agente irritante o rascado por parásitos y otras enfermedades pruriginosas. Por otro lado, la enfermedad subyacente puede actuar sistémicamente, reduciendo la resistencia a infecciones cutáneas,

como las de origen inmunológico o en enfermedades cutáneas metabólicas (Ettinger y Feldman, 2007).

Las lesiones observables en este tipo de infecciones piogénicas son las pústulas, pápulas como lesiones primarias y collaretes epidérmicos como secundarias (Ettinger y Feldman, 2007). La presencia de pústulas y pápulas producidas por una infección bacteriana se asocia, a menudo, a prurito concomitante debido a la secreción de enzimas proteolíticas por parte de las bacterias presentes en la lesión (Hnilica y Patterson, 2017). Estas lesiones pueden romperse espontáneamente o alterar su apariencia como consecuencia de un autotraumatismo inducido por el prurito intenso. Por lo tanto, estas lesiones primarias pueden cambiar, dejando sólo la presencia de lesiones secundarias como erosiones, costras, collaretes epidérmicos y alopecia. A medida la enfermedad se vuelve crónica pueden desarrollarse nuevos cambios en la piel como hiperpigmentación y liquenización (Ettinger y Feldman, 2007; Hnilica y Patterson, 2017).

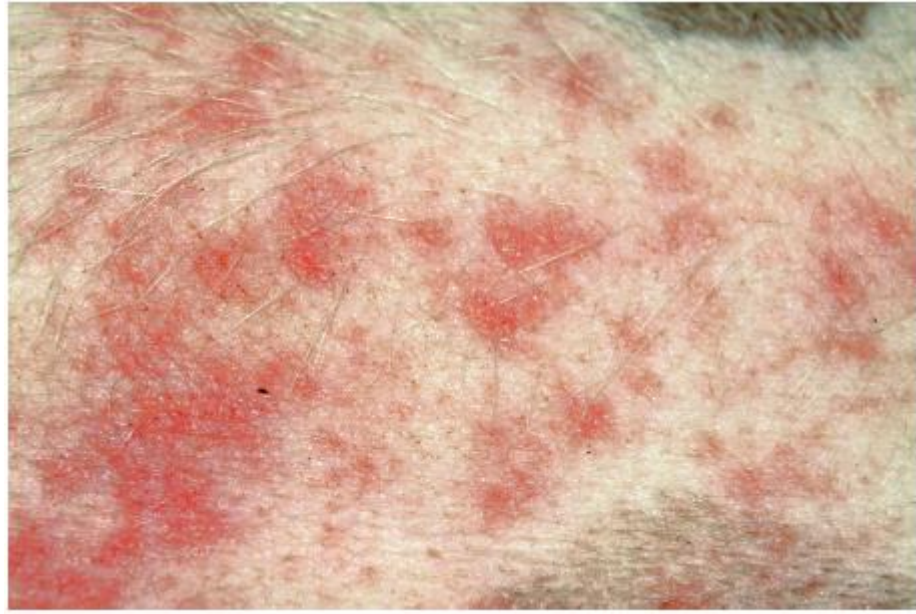


Figura 1. Erupción papular en el abdomen de un perro alérgico causada por *Staphylococcus* sp. multirresistente (Hnilica y Patterson, 2017).



Figura 2. Piodermia Superficial. Collaretes epidérmicos típicos en un perro con piodermia (Hnilica y Patterson, 2017).

2.1.2. Género *Staphylococcus*

Dentro del género *Staphylococcus* existe una gran variedad de microorganismos comensales de la piel y membranas mucosas que pueden actuar como patógenos oportunistas en diferentes enfermedades estudiadas en medicina veterinaria

Los estafilococos están presentes en la naturaleza ampliamente tanto en mamíferos como en aves, colonizando la cavidad nasal, naso-faringe, piel y membranas mucosas (Markey *et al.*, 2013). Suelen sobrevivir prolongadamente en el ambiente debido a su resistencia al calor, toleran altas concentraciones de cloruro de sodio y algunos desinfectantes, lo que permite la transmisión indirecta (Markey *et al.*, 2013).

Los estafilococos pueden actuar como patógenos oportunistas al estar presentes en tejidos lesionados o con alteración de la microbiota (Quinn *et al.*, 1994; Vigo *et al.*, 2015). Las especies patógenas de estafilococos causan lesiones piógenas asociadas con la formación de pústulas, abscesos y supuración (Markey *et al.*, 2013).

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos gram-positivos con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , que tienden a estar dispuestos en pares, tétradas, o frecuentemente agrupados en racimos irregulares o a manera de “racimos de uvas”. Las colonias son generalmente de color blanco con bordes regulares, son inmóviles, no esporulan, la mayoría de las especies poseen un

metabolismo fermentativo y son anaerobios facultativos (Murray *et al.*, 2007; Markey *et al.*, 2013).

Actualmente, el género *Staphylococcus* se compone de más de 35 especies (Bergey *et al.*, 2009; Lamers *et al.*, 2012). Generalmente, tienen una relación benigna o simbiótica con sus huéspedes, pero pueden volverse patógenos después de obtener la entrada al tejido del huésped a través de un trauma en la barrera cutánea, la inoculación con agujas o la implantación directa de dispositivos médicos (Murray *et al.*, 2007).

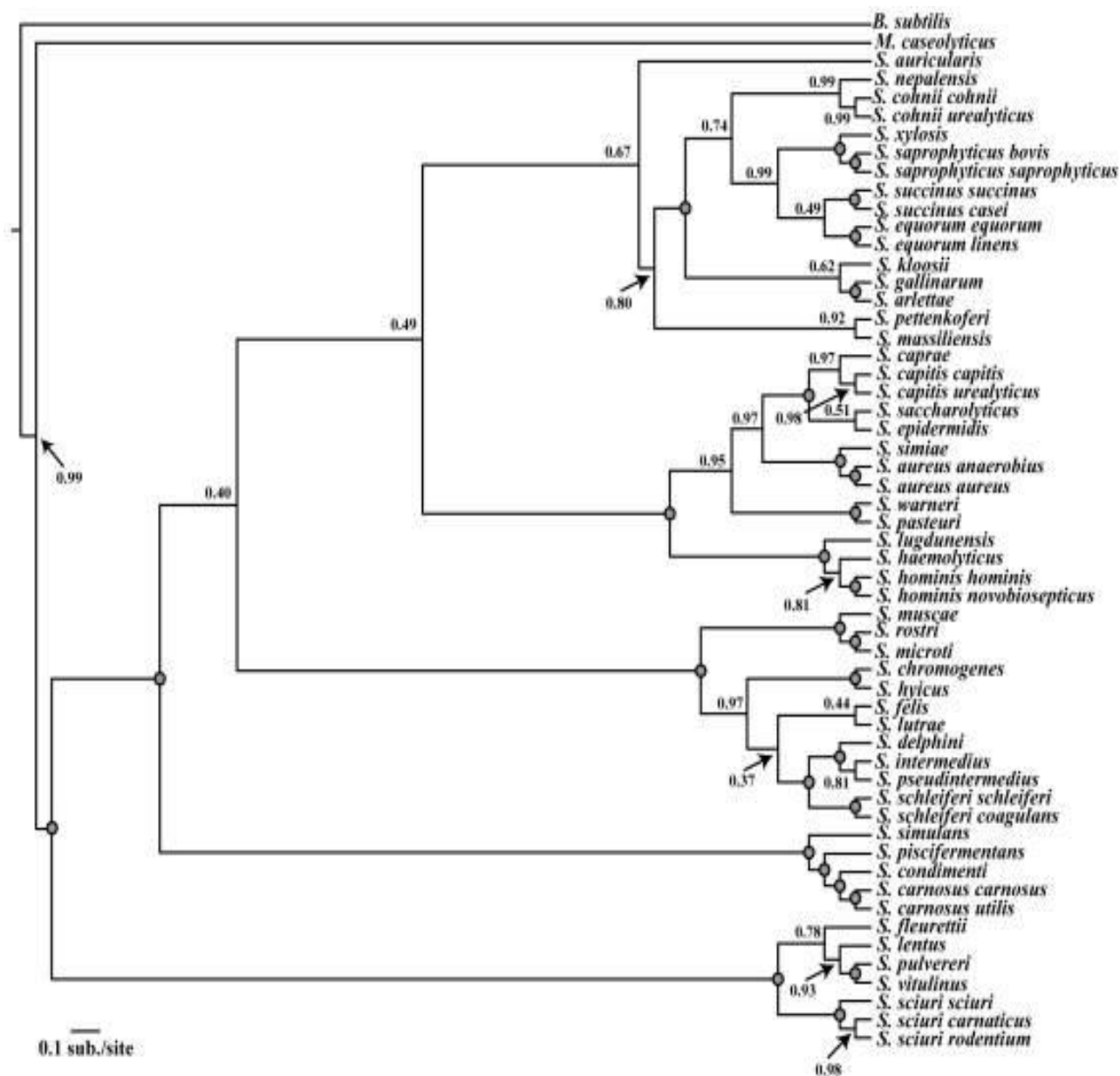


Figura 3. Inferencia de la filogenia estafilocócica utilizando la metodología de estimación bayesiana de árboles de especies (BEST) en base al ARNr 16S (Lamers *et al.*, 2012)

2.1.2.1. *Staphylococcus pseudintermedius*

En el año 2005, el *Staphylococcus intermedius*, una especie productora de coagulasa reconocido como la principal bacteria involucrada en la mayoría de las piodermias caninas, fue reclasificado en tres especies similares fenotípicamente: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y *S. delphini* (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007).

Las colonias de *S. pseudintermedius* son generalmente hemolíticas. Las pruebas de catalasa y coagulasa son positivas, la coagulación generalmente se puede observar después de cuatro horas de incubación a 35 ° C. La prueba de beta-galactosidasa, la fermentación de trehalosa y la ausencia de fermentación de xilosa se pueden usar para diferenciar esta especie de otros estafilococos. Sin embargo, la identificación definitiva es más confiable usando métodos moleculares (Markey *et al.*, 2013). Estudios en China y Japón han determinado que el *Staphylococcus pseudintermedius* es la causa más común de infecciones cutáneas caninas con porcentajes del 76% al 90% (Onuma *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012)

2.1.2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una de las bacterias de mayor importancia en el ser humano. Las colonias producen diversos grados de hemólisis, son coagulasa-positivo, suele formar colonias de color gris blanquecino a amarillo dorado, en agar sangre, y es capaz de fermentar el manitol (Brooks *et al.*, 2011).

El *S. aureus* causa diversas afecciones que varía en gravedad desde una infección cutánea leve o intoxicación mediante alimentos hasta infecciones graves que representan un riesgo a la vida del paciente. Este estafilococo es microbiota humana normal y en ocasiones causa infecciones, a menudo relacionadas con dispositivos implantados, como prótesis articulares, derivaciones y catéteres intravasculares, sobre todo en los niños muy pequeños y en los pacientes inmunodeprimidos (Brooks *et al.*, 2011).

2.1.2.3. Resistencia antimicrobiana

Desde hace muchos años se ha reconocido al *Staphylococcus aureus* como uno de los principales agentes patógenos en humanos, siendo habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre (Bustos *et al.*, 2006). En el año 1960 se publica en Europa (Reino Unido) la aparición de la primera cepa de *S. aureus* con un nuevo mecanismo que le confiere resistencia a meticilina (SARM), luego de 8 años es descrita en América (EEUU) en el año 1968 (Lyon y Skurray, 1987). Posteriormente se ha logrado aislar SARM de lesiones en perros (Gortel *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 1999; Tomlin *et al.*, 1999). De igual manera se han reportado *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina (SPRM) tal como lo documenta Hanselman *et al.* (2009)

Existe conocimiento sobre el mecanismo de resistencia de *Staphylococcus* spp. frente a la meticilina; esta se basa a nivel molecular por la presencia de un elemento cromosomal móvil, llamado “Staphylococcal Cassette Chromosome” o *SCCmec*, que contiene al gen *mecA*, que confiere resistencia

a meticilina (Bannoehr *et al.*, 2012). Este gen *mecA* no es endógeno, y se encuentra integrado al cromosoma bacteriano; el producto de su expresión es una proteína de unión a Penicilina, llamada PBP2' (Chambers 1997). Esta proteína provoca la reacción de transpeptidación necesaria para el entrecruzamiento de peptidoglicanos, lo cual permite la formación de la pared celular en presencia de antibióticos (Lim y Strynadka, 2002).

Por otro lado, el crecimiento de las tasas de resistencia a diversos antibióticos como las tetraciclinas y fluroquinolonas se ha visto favorecido por el abuso y uso excesivo de antibióticos en la población humana y en mascotas (Hnilica y Patterson, 2017), además del uso generalizado del agente tanto como promotor del crecimiento animal como para el control de infecciones en la práctica veterinaria, en la agricultura y la acuicultura (Chopra y Roberts 2001; Levy 2001).

2.1.2.4. Factores de virulencia

Las toxinas estafilocócicas descritas hasta la fecha se pueden clasificar en tres grupos principales: superantígenos de toxina pirogénica (PTSAgs), que comprenden la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST) y las enterotoxinas estafilocócicas (SE); toxinas exfoliativas; y citotoxinas tales como leucocidinas y hemolisinas (Pitchenin *et al.*, 2018).

Los superantígenos de toxina pirogénica son proteínas exocelulares que pueden estimular la proliferación policlonal de linfocitos T formando un complejo que une el complejo de histocompatibilidad II a la porción variable

del receptor β o α de linfocitos T, lo que resulta en la producción de niveles tóxicos de citoquinas (Fraser y Proft, 2008; Ortega *et al.*, 2010).

Dieciocho enterotoxinas estafilocócicas y sus variantes son responsables de la intoxicación alimentaria tóxica causada por *Staphylococcus aureus*. Otras enfermedades como la mastitis, la artritis, la dermatitis atópica, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Kawasaki y las enfermedades autoinmunes se han asociado con enterotoxinas (Thomas *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 2001).

La toxina exfoliativa SIET de *S. pseudintermedius* y la toxina exfoliativa EXI posiblemente desempeñan un papel en la patogénesis de las lesiones cutáneas caninas y la otitis crónica (Iyori *et al.*, 2011; Garbacz *et al.*, 2013). *S. intermedius* produce una leucotoxina bicomponente (Luk-I) similar a la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) de *S. aureus*, que también está codificada por dos genes, LukS-I y LukF-I (Futagawa *et al.*, 2004).

2.2. Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* y estafilococos del grupo de los intermedius (SIG)

2.2.1. Medios de cultivo

Habitualmente la siembra se puede realizar en agar sangre ovino al 5%, de lo contrario se puede realizar en un agar general como el Tripticasa de soya o agar nutriente. Sin embargo, es importante aclarar que la siembra en agar sangre permite ver el tipo de hemólisis lo cual favorece a una mejor identificación. La

incubación de las placas sembradas se realiza a una temperatura de 35-37 ° C durante 24 a 48 horas. Paralelamente se puede inocular una placa de agar MacConkey para detectar cualquier bacteria gramnegativa que también pueda estar presente en la muestra. (Murray *et al.*, 2007; Markey *et al.*, 2013).

Las muestras de fuentes contaminadas también se pueden sembrar en un medio selectivo, que inhibirá el crecimiento de microorganismos gramnegativos, pero permitirá que crezcan estafilococos y algunos otros cocos grampositivos, como el agar manitol salado, Agar de colistina-ácido nalidíxico, agar de alcohol feniletílico y medio Baird-Parker (Markey *et al.*, 2013).

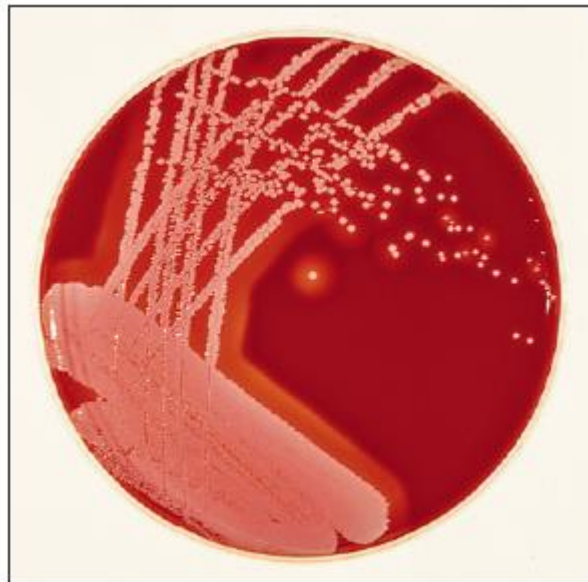


Figura 4. *Staphylococcus pseudintermedius* en agar sangre de oveja
(Markey *et al.*, 2013).

Agar Manitol Salado

El agar de sal de manitol es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *S. aureus*. La base nutritiva incluye peptonas, extracto de carne de res, manitol y, como indicador, rojo de fenol. La naturaleza selectiva del medio es el alto contenido de sal (7,5% de NaCl), que inhibe la mayoría de los organismos, excepto los estafilococos (Murray *et al.*, 2007). La utilidad del agar manitol radica en que puede ayudar a diferenciar a la mayoría de *S. aureus* de estafilococos del SIG, ya que fermenta este carbohidrato virando a color amarillo; siendo positivo para *S. aureus*. Sin embargo, en el caso de *Staphylococcus pseudintermedius* puede también fermentar el manitol débilmente lo cual se debe tener en cuenta al momento de la interpretación y cuando se prolonga la incubación por más de 24 horas (Murray *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007).



Figura 5. *S. aureus* (izquierda) y *S. epidermidis* (derecha) en sal de manitol agar (Markey *et al.*, 2013).

2.2.2. Tinción Gram

La tinción Gram o la tinción de Gram es una técnica de laboratorio que distingue dos grupos de bacterias, en base a la identificación de diferencias en la estructura de sus paredes celulares. Es una herramienta importante en el proceso de identificación bacteriana al dividir las bacterias en dos grupos, los Gram-positivos y Gram-negativos, y al permitir que se vean claramente sus tipos morfológicos cocos o en forma de bacilo (Sandle, 2004).

El primer paso consiste en tomar colonias jóvenes (18-24 horas a 37°C) aisladas y fijar por calor las células en un portaobjetos. A continuación, las células se tiñen con un tinte básico, el cristal violeta, que tiñe de azul todas las células bacterianas. El segundo paso consiste en agregar una solución de yoduro de yodo y potasio. La solución de yodo entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el colorante cristal violeta. Para el tercer paso, las células se tratan con alcohol-acetona, en el cual es soluble el complejo cristal violeta-yodo. Tras aplicar el disolvente, solo las células grampositivas permanecen teñidas. Después del procedimiento de tinción, las células se tratan con una contratinción. Se puede emplear la safranina, para hacer visibles las células gramnegativas (decoloradas). Las células gramnegativas se verán de color fucsia y las células grampositivas se observarán de color violeta. La lámina se examina microscópicamente utilizando un objetivo 100x (Sandle, 2004).

2.2.3. Catalasa, oxidasa y coagulasa

Catalasa

El peróxido de hidrogeno, si se acumula es tóxico para las células bacterianas; por ello, ciertas bacterias poseen la enzima catalasa que convierte

el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (MacFaddin, 2003). Esta prueba detecta consiste en detectar esta enzima. Se debe emplear el reactivo, peróxido de hidrógeno al 3%, debe almacenarse a + 4 ° C en una botella oscura. En el caso de que la bacteria se haya cultivado en agar sangre, hay que tener cuidado, ya que la presencia de glóbulos rojos puede provocar una reacción falso positivo; por otro lado esta prueba es de gran utilidad para la diferenciación del género *Staphylococcus* del *Streptococcus* (Markey *et al.*, 2013).

Oxidasa

El fundamento de la prueba de oxidasa consiste en la producción por parte de la bacteria de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción se debe a la presencia del sistema citocromo oxidasa, la cual activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que al mismo tiempo actúa como aceptor final de electrones del sistema de transferencia. (MacFaddin, 2000).

Los reactivos utilizados en las pruebas deben ser incoloros, almacenarse en una botella oscura a 4 ° C; por otro lado, si las soluciones se vuelven azul oscuro, no deben utilizarse (Markey *et al.*, 2013).

Coagulasa

La prueba de coagulasa se utiliza para detectar coagulasa libre o coagulasa unida (factor de aglomeración) y diferenciar *Staphylococcus* productor de coagulasa de otros *Staphylococcus* spp. Se puede emplear el plasma de conejo deshidratado con EDTA se disponible comercialmente (Murray *et al.*, 2007). La prueba de coagulasa en tubo detecta coagulasa unida y libre. Observar si

ocurre la coagulación a intervalos durante las primeras 4 h, ya que algunos estafilococos producen fibrolisina, que podría lisar el coágulo. No agitar el tubo mientras se verifica la coagulación. La formación de un coágulo se considera positiva. La mayoría de los aislados de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos formarán un coágulo dentro de las 4 h (Murray *et al.*, 2007).

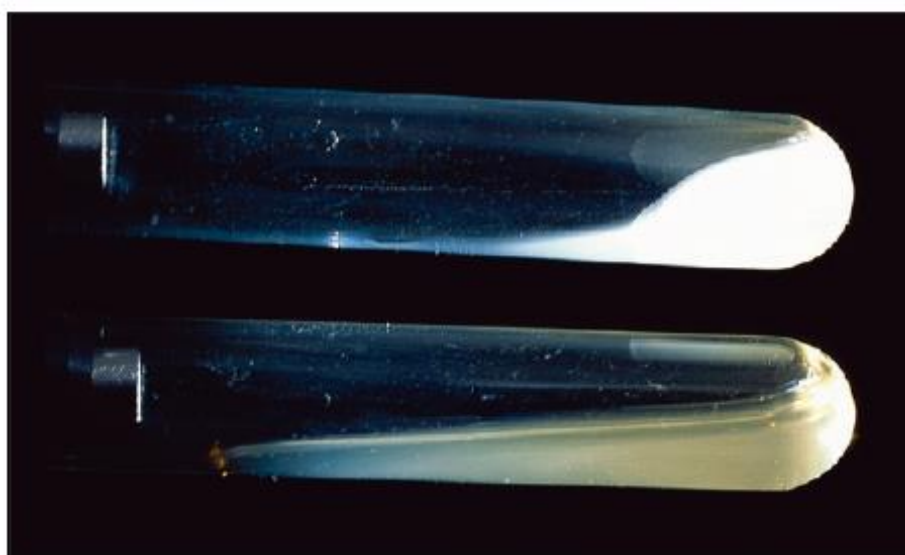


Figura 6. Prueba de coagulasa en tubo: positiva, superior; y negativa, inferior. (Markey *et al.*, 2013).

2.3. Identificación molecular de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*

2.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis, en los laboratorios de CETUR Corporation, en Estados Unidos, el cual lo hizo acreedor del premio Nobel en 1993 (Salazar *et al.*, 2013). El fundamento se centró en la necesidad de obtener un gran número de copias de secuencias específicas de ADN *in vitro* de manera económica y

rápida basándose en ciclos repetitivos de tres temperaturas (Mülhardt, 2007; Salazar *et al.*, 2013).

A partir del primer reporte que se realizó del *S. pseudintermedius* por Devriese *et al.* (2005) mediante el método de hibridación ADN-ADN, se buscó métodos más rápidos y baratos para su identificación; es así como se planteó alternativas al PCR multiplex (Sasaki *et al.*, 2010), secuenciación parcial del *tuf* (Heikens *et al.*, 2005), *sodA* y *hsp60* (Sasaki *et al.*, 2007) pero no siempre fueron concluyentes (Verstappen *et al.*, 2017).

En el caso de identificación de *Staphylococcus aureus* se ha elaborado diferentes protocolos, uno de los más usados es la amplificación del gen *nuc* que produce una nucleasa termoestable extracelular (Brakstad *et al.*, 1992). Años después, Bannoehr *et al.* (2009) estandarizó un PCR-RFLP para identificar tanto *S. pseudintermedius* como *S. aureus*.

2.3.2. Enzima de restricción MboI

Las enzimas de restricción o endonucleasa de restricción son aquella que puede reconocer una secuencia de nucleótidos en concreto dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto, llamado sitio de restricción, o en un sitio no muy lejano a este. Los sitios de restricción cuentan con entre cuatro y seis pares de bases, con las que son reconocidos (Salazar *et al.*, 2013). La enzima MboI es una enzima de restricción de tipo II, en este tipo de endonucleasa, cada subunidad del dímero reconoce la misma secuencia,

presente en cada una de las partes especulares del palíndromo, y realiza un corte en un lugar específico (Salazar *et al.*, 2013). La enzima MboI, reconoce la secuencia no metilada de doble cadena GATC y escinde antes de G, la escisión endonucleolítica de ADN produce fragmentos bicatenarios específicos con fosfatos terminales 5' (Ueno *et al.*, 1993).

2.3.3. PCR-RFLP y gen *pta*

Sasaki *et al.* (2007) en base a bioquímicas intentó diferenciar al *S. pseudintermedius* de las otras especies del SIG, no logrando identificar marcadores fenotípicos para discriminar al *S. pseudintermedius*, la especie de mayor relevancia clínica en caninos. Hasta en esos años la identificación precisa de *S. pseudintermedius* se basaba en la secuenciación. (Sasaki *et al.*, 2007; Bannoehr *et al.*, 2007). Sin embargo, Bannoehr *et al.* (2009) elaboró un método de reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) amplificando una secuencia del gen *pta*; logrando así, diferenciar al *S. pseudintermedius* y *S. aureus* de otras especies del género.

El gen “*pta*” posee un tamaño de 990 pb, el cual que codifica la enzima fosfoacetiltransferasa de 329 aminoácidos. Dicha enzima convierte reversiblemente acetil-CoA y fosfato inorgánico en acetil~P y CoA (Wolf 2005; Tse *et al.*, 2011).

La identificación mediante este PCR-RFLP se basó en una secuencia de 320pb del gen “*pta*”, reveló la presencia de un sitio de restricción MboI en todos los aislados de *S. pseudintermedius* y su ausencia en todos los aislados

examinados de *S. intermedius* y *S. delphini*; por otro lado, *S. aureus* si poseía el sitio de restricción en este gen pero en un sitio diferente al del *S. pseudintermedius* lo que permitió diferenciarlos (Bannoehr *et al.*, 2009).

2.4.Importancia de *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* en salud pública.

Existen pocos estudios sobre infecciones bacterianas en piel de caninos en el Perú. Antunez *et al.*, (2009) registró un 78,3% de infecciones por *Staphylococcus* sp. de muestras entre los años 2000 al 2006 de diferentes veterinarias de Lima metropolitana. En este encontró mediante pruebas bioquímicas un 70.6% de *Staphylococcus intermedius* y 2% de *S. aureus*.

Por otro lado, se ha evidenciado la transmisión de *Staphylococcus pseudintermedius* entre humanos y perros que han estado en contacto, notándose un aumento en los reportes de infecciones clínicas por *Staphylococcus pseudintermedius* en humanos, tales como bacteriemia (Vandenesch *et al.*, 1995), absceso cerebral (Atalay *et al.*, 2005), neumonía (Gerstadt *et al.*, 1999), heridas quirúrgicas (Lee, 1994) y hasta un marcapaso cardiaco infectado (Van Hoovels *et al.*, 2006; Riegel *et al.*, 2011).

Este tipo de cepas es de importancia en la salud pública; ya que, sin formar parte de la microbiota habitual, como si es el caso de *Staphylococcus aureus*, principal colonizador de piel y mucosas en humanos (Kluytmans y Wertheim, 2005; Bustos *et al.*, 2006), las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina (SPRM) actualmente son aisladas de diversas lesiones

en humanos, pudiendo convertirse en un microorganismo residente capaz de ser transmitido entre personas (Guardabassi *et al.*, 2004; Riegel *et al.*, 2011). La transmisión bacteriana a partir de mascotas a dueños y viceversa es notificado con mayor frecuencia, como lo evidenció el estudio realizado por Hanselman *et al.* (2009), donde 242 humanos fueron evaluados para determinar la colonización de *Staphylococcus* sp. a causa de sus mascotas, se obtuvo como resultado 4.1% (10/242) de prevalencia en la evaluación de la colonización nasal por *Staphylococcus pseudintermedius*, mientras que para cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina (SPRM) se obtuvo una prevalencia de 0.4% (1 humano).

El contacto estrecho entre humanos y mascotas ha hecho posible que cepas de *S. aureus* sean aisladas de animales, representando de esta manera patógenos de importancia en medicina veterinaria (Devriese, 1990). Es así como en los últimos años se sigue reportando la presencia de *S. aureus* en hisopados de piel de perros, tal como lo demuestra Katakweba *et al.* (2016) quien halló en Tanzania 11% *S. aureus* (11/100), de igual forma en Zambia se encontró el 13.6% de *S. aureus* (Jung-Ho *et al.*, 2014) y en Corea del Sur 8.1% de *S. aureus* del total de aislados (Moon *et al.*, 2012).

La resistencia a meticilina de *S. aureus* (SARM) es reportado desde hace más de 50 años en medicina humana (Lyon y Skurray, 1987). En medicina veterinaria, se han notificado casos de infecciones por SARM en perros (Gortel *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 1999; Tomlin *et al.*, 1999) como en Holanda y Estados Unidos que se reportó la transmisión de SARM entre un perro y su

dueño (Van Duijkeren *et al.*, 2003; Manian 2003). Además, varios estudios han demostrado que las clonas de SARM que circulan en animales domésticos, como el perro, son similares a los identificados en humanos y pertenecen principalmente a clones adquiridos en hospitales (Loeffler y Lloyd, 2010). Esto es clínicamente importante ya que los aislados de SARM adquiridos en hospitales generalmente llevan más genes de virulencia (Mutters *et al.*, 2016; Ballhausen *et al.*, 2017). Por tanto, la epidemiología sugiere que los humanos pueden ser la fuente de SARM aislado en perros, y luego los perros actuar como reservorio capaz de causar reinfecciones humanas en contextos específicos (Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Lugar de ejecución y periodo de duración

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) durante los meses de setiembre del 2018 a abril del 2019.

3.2.Descripción del material experimental

Se utilizaron 141 aislados criopreservados, previamente identificados como *Staphylococcus* sp., provenientes de perros con piodermia durante los años 2016-2018. Las muestras se obtuvieron mediante hisopados en las zonas con lesiones compatibles con piodermia (Pápulas, pústulas o collaretes epidérmicos) y fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales.

3.3.Materiales y Equipos

- ✓ Flujo laminar (DNA/RNA UV Cleaner Box - *BIOSAN*)
- ✓ Termociclador Biometra TOne by *Analytik Jena*
- ✓ Equipo de electroforesis (*Cleaver Scientific*)
- ✓ Microcentrífuga (*Thermo Scientific*)
- ✓ Vortex (*IsoLab*)
- ✓ Estufa PRECISION *Thelco* (Rango de T° hasta 60°)
- ✓ Bloque de calor (*Thermo Scientific*)
- ✓ Transiluminador (*Cleaver Scientific*)

- ✓ Congeladora (-20°C) *Bosch* ®
- ✓ Espectrofotómetro *DeNovix* DS-11FX
- ✓ Micropipetas de 1000, 100 y 10 µl. *Eppendorf*
- ✓ Viales estériles de 1,5 ml, 0,5 ml y 0,2 ml *Eppendorf*
- ✓ Punteras de micropipeta estériles de 1000, 100 y 10 µl. *Eppendorf*
- ✓ Gradillas
- ✓ PCR Cooler *Eppendorf*®
- ✓ Guantes de nitrilo

3.4.Reactivos

- ✓ Kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit)
- ✓ 2X PCR HotStart MasterMix *Aplied Biological Materials* ABM ®
- ✓ Cebadores *Macrogen Inc* (Cuadro 1)
- ✓ Agua grado molecular- libre de nucleasas IDT (*INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES*)
- ✓ Lisozima (50 mg/ml) *Merck*
- ✓ Etanol absoluto EMSURE®
- ✓ Agarosa *SIGMA Aldrich*
- ✓ Buffer TBE 10 x *Cleaver Scientific*
- ✓ Marcador de peso molecular 100bp Opti DNA Marker *Aplied Biological Materials* ABM ®
- ✓ Buffer de Carga Safe-green *Aplied Biological Materials* ABM ®
- ✓ EDTA 50 mM

3.5. Metodología

3.5.1. Reactivación de aislados

Los aislados de *Staphylococcus* spp. estaban criopreservados en glicerol al 15% a -20°C, para su evaluación se realizó la reactivación de éstos. Para ello, se extrajo 100 uL del vial correspondiente y se colocó en caldo Tripticasa de soja (TSB) y se incubó durante 18-24 horas a 37°C posteriormente se sembró en agar sangre y agar manitol salado.

3.5.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó con el kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit - *Thermo Scientific* ® *Lituania*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Primero, se tomó una colonia aislada de *Staphylococcus* sp. en agar sangre, se la colocó en caldo TSB y se incubó durante 18 horas. Luego, se tomó 1mL de este caldo, se centrifugó a 10 000 RPM y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en el buffer de lisis preparado según las recomendaciones del kit de extracción, posteriormente se siguió la metodología descrita por el fabricante (ANEXO 1).

Una vez extraído el ADN se cuantificó todas las muestras mediante espectrofotometría (ANEXO 2, 3 y 4).

3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Para la estandarización del procedimiento se tomó como referencia el protocolo empleado por Bannoehr *et al.* (2009) con algunas modificaciones, así como también los cebadores empleados (Cuadro 1). Para lo cual, se realizó un PCR en gradiente con 3 temperaturas de hibridación 51°C, 53°C y 55 C°, y se evaluó la óptima formación de las bandas mediante la electroforesis.

Se estandarizó el protocolo con una temperatura de hibridación de 53°C y se amplificó todas las muestras con las siguientes condiciones: En un volumen de 30 µL con una concentración de 0,2 µM de cada cebador y 15uL de 2X PCR HotStart MasterMix ABM ® (0,2 mM de dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 0,5 U HotStart DNA Polymerase) y 2uL ADN (30 – 70 ng/uL de ADN). Las condiciones de termociclado incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos seguido por 30 ciclos de 95 °C de desnaturalización durante 1 minuto, 53°C de hibridación durante 1 minuto y 72°C para la elongación durante 1 min, con una elongación final de 72°C durante 7 min.

Cuadro 1. Secuencia de cebadores para el gen *pta*.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Producto	Referencia
<i>Pta forward</i>	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA	320pb	Bannoehr <i>et al.</i> , 2009
<i>Pta reverse</i>	GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG		

Digestión con enzima MboI

Luego de obtener los productos del PCR se realizó la digestión con la enzima MboI en su respectivo buffer 10X. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

- ✓ En un vial de 0,2mL se colocó 1.6 uL de buffer 10X y 9uL de agua grado molecular.
- ✓ Luego se añadió 0.5 uL (5U) de MboI (10U/uL) *Thermo Scientific*™
- ✓ Por último, se agregó 5uL del producto de PCR y se incubó durante 2 horas a 37 grados.

3.5.4. Electroforesis

Para la corrida electroforética, primero, se preparó el gel de agarosa al 2%. Luego de ello se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se le añadió buffer TBE al 0.5X. Los productos de digestión se mezclaron con el buffer de carga *Safe Green*™ para luego ser colocados en su respectivo pocillo en el gel, adicionalmente se colocó en el gel un marcador de peso molecular 100bp Opti DNA Marker, y se corrió durante 90 minutos a 80 voltios. Los productos fueron analizados en el transiluminador SafeVIEW de luz azul.

Interpretación de la electroforesis

Debido a la presencia del sitio restricción MboI en el gen *pta* del *Staphylococcus pseudintermedius* este se evidenciará en la electroforesis en dos bandas de pesos distintos 213 pb y 107 pb. En contraste con las otras especies del SIG (*S. intermedius* y *S. delphini*) que no poseen este sitio de restricción, por lo cual se mantienen como una banda de 320pb luego de ser

sometidas a la digestión. Por otro lado el *Staphylococcus aureus* si posee el sitio de restricción MboI, pero en diferente ubicación, por lo cual las bandas serán de 156 pb y 164 pb, que al tener pesos similares se evidenciarán como si fueran una sola banda. Esto permitirá su diferenciación con el *Staphylococcus pseudintermedius*.

3.5.5. Secuenciamiento para la validación de los productos identificados como *S. pseudintermedius*

Para la validación de los resultados se envió dos productos para su secuenciamiento a Macrogen, Inc. Corea del Sur. Los productos enviados fueron muestras que amplificaron el gen *pta*, y además a la digestión con la enzima MboI dieron como resultado un producto de 213 bp y 107 bp.

IV RESULTADOS

Todos los aislados criopreservados identificados bioquímicamente como *Staphylococcus* sp. de piodermias caninas durante el periodo del 2016 al 2018 (141) amplificaron la secuencia del gen *pta* de 320 pb, lo cual los identifica como perteneciente al género *Staphylococcus*. Posteriormente, se realizó la digestión con la enzima de restricción MboI (PCR-RFLP) al total de aislados de *Staphylococcus* sp., obteniéndose que el 87.9% (124/141) si posee el sitio de restricción MboI dando como resultado un producto de 213 pb y otro 107 pb lo cual los identifica como *Staphylococcus pseudintermedius* (Figura 8).

Por otro lado, no se encontró aislados que amplifique el gen *pta*, y que, al ser sometidos a la digestión con la enzima MboI, corte la secuencia en un lugar diferente resultando en bandas de 156 pb y otra de 164 pb, esto lo identificaría como *Staphylococcus aureus*. Por último, el 12.1% (17/141) de los aislados solo amplificó el gen *pta*, pero al ser digeridas no hubo fragmentación de la

secuencia y se mantuvo como una sola banda de 320pb, por lo cual se les identificó como otras especies distintas dentro del género *Staphylococcus*.
(Cuadro 2 y Figura 7)

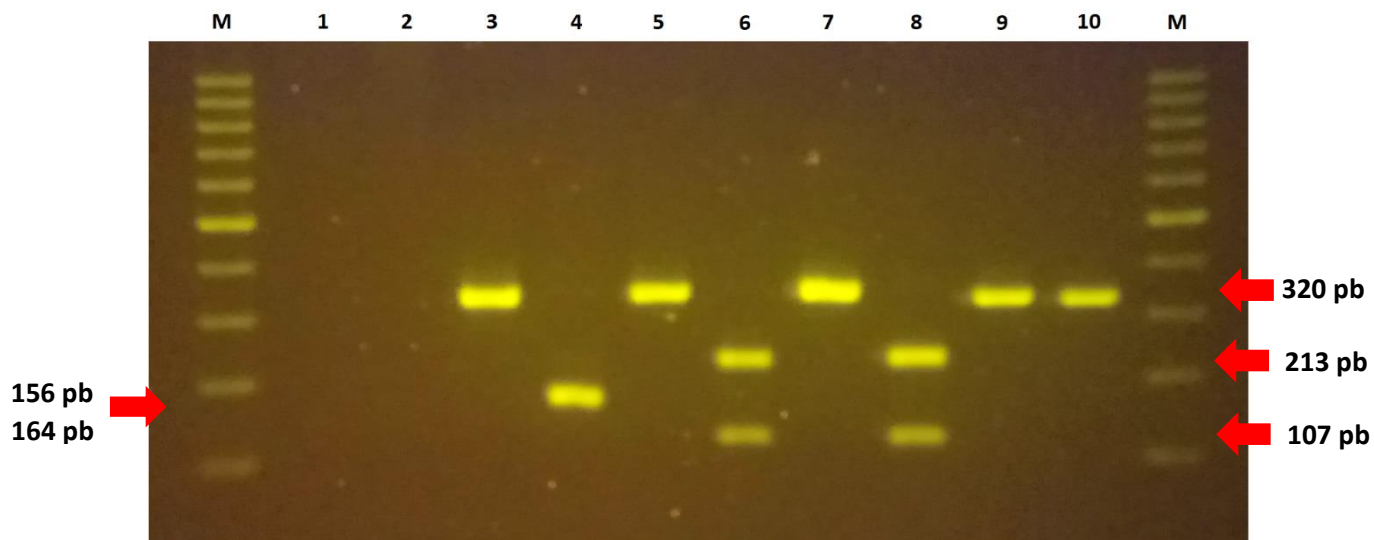


Figura 7. Gel de electroforesis de los productos de *pta* digeridos con la enzima MboI. M: Marcador molecular 100 bp. Línea 1: Blanco de reacción. Línea 2: Control Negativo *E. coli* ATCC 8739. Línea 3: Control Positivo *Staphylococcus aureus* ST 18. Línea 4: Control Positivo *Staphylococcus aureus* ST18 con digestión MboI. Línea 5: *Staphylococcus pseudintermedius* S29. Línea 6: *Staphylococcus pseudintermedius* S29, con digestión MboI. Línea 7: *Staphylococcus pseudintermedius* S60. Línea 8: *Staphylococcus pseudintermedius* S60, con digestión MboI. Línea 9: *Staphylococcus* sp. ST 19. Línea 10: *Staphylococcus* sp. ST19 con digestión MboI.

El amplicón del gen *pta* de los aislados S29 y S60 fueron enviados a Macrogen, Inc. para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas ChromasPro, BLASTN 2.9.0 y MegAlign Pro. Luego del alineamiento con otras secuencias del mismo gen disponibles en el banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), esta mostró un 99,7% de identidad con el gen *pta* de la cepa *Staphylococcus pseudintermedius* HKU10-03

(NC_014925.1) (Figura 9) y con otras cepas obtuvo 99% de identidad (KJ14608.1 y AM945758.1).

Las secuencias amplificadas del gen *pta* de los aislados S29 y S60 fueron ingresadas al banco de genes del NCBI con números de acceso MN480439 y MN480440.

Alignment Workspace of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, IUB)
domingo, 20 de Octubre de 2019 13:44

	AAAGACAAACTTTTCAGGTAAAAATGTGCGT	ATCATCCAACCTGATACGAGCGACCTAAAA
	10 20 30	190 200 210
Cepa S29.seq	AAAGACAAACTTTTCAGGTAAAAATGTGCGT 30	ATCATCCAACCTGATACGAGCGACCTAAAA 210
Cepa S60.seq	AAAGACAAACTTTTCAGGTAAAAATGTGCGT 30	ATCATCCAACCTGATACGAGCGACCTAAAA 210
S. pseudint. HKU10-03.	AAAGACAAACTTTTCAGGTAAAAATGTGCGT 30	ATCATCCAACCTGATACGAGCGACCTAAAA 210
	ATCGTATTACCAGAAGGAGAAGATGAGCGT	GCAACACTCGTTGAACAATTTGTAGAACGT
	40 50 60	220 230 240
Cepa S29.seq	ATCGTATTACCAGAAGGAGAAGATGAGCGT 60	GCAACACTCGTTGAACAATTTGTAGAACGT 240
Cepa S60.seq	ATCGTATTACCAGAAGGAGAAGATGAGCGT 60	GCAACACTCGTTGAACAATTTGTAGAACGT 240
S. pseudint. HKU10-03.	ATCGTATTACCAGAAGGAGAAGATGAGCGT 60	GCAACACTCGTTGAACAATTTGTAGAACGT 240
	GTATTAACAGCCGCTGTTGATTTACAAGCT	CGTAAAGGGAAAGCGACTGAAGAACAAGCA
	70 80 90	250 260 270
Cepa S29.seq	GTATTAACAGCCGCTGTTGATTTACAAGCT 90	CGTAAAGGGAAAGCGACTGAAGAACAAGCA 270
Cepa S60.seq	GTATTAACAGCCGCTGTTGATTTACAAGCT 90	CGTAAAGGGAAAGCGACTGAAGAACAAGCA 270
S. pseudint. HKU10-03.	GTATTAACAGCCGCTGTTGATTTACAAGCT 90	CGTAAAGGGAAAGCGACTGAAGAACAAGCA 270
	TCTGACTATGTTGCGCCGATCGTATTAGGG	CAATCGTTATTAAATGATGTGAAGTACTTTC
	100 110 120	280 290 300
Cepa S29.seq	TCTGACTATGTTGCGCCGATCGTATTAGGG 120	CAATCGTTATTAAATGATGTGAAGTACTTTC 300
Cepa S60.seq	TCTGACTATGTTGCGCCGATCGTATTAGGG 120	CAATCGTTATTAAATGATGTGAAGTACTTTC 300
S. pseudint. HKU10-03.	TCTGACTATGTTGCGCCGATCGTATTAGGG 120	CAATCGTTATTAAATGATGTGAAGTACTTTC 300
	AATGTTGACAAAATTAAAGCACTTGCTGCA	GGTACAATGCTTGTTTATGC
	130 140 150	310 320
Cepa S29.seq	AATGTTGACAAAATTAAAGCACTTGCTGCA 150	GGTACAATGCTTGTTTATGC 320
Cepa S60.seq	AATGTTGACAAAATTAAAGCACTTGCTGCA 150	GGTACAATGCTTGTTTATGC 320
S. pseudint. HKU10-03.	AATGTTGACAAAATTAAAGCACTTGCTGCA 150	GGTACAATGCTTGTTTATGC 320
	GAAAAATCTTTAAATATTGAAGGTTTAAAT	
	160 170 180	
Cepa S29.seq	GAAAAATCTTTAAATATTGAAGGTTTAAAT 180	
Cepa S60.seq	GAAAAATCTTTAAATATTGAAGGTTTAAAT 180	
S. pseudint. HKU10-03.	GAAAAATCTTTAAATATTGAAGGTTTAAAT 180	

Figura 8. Alineamiento de las secuencias del gen *pta* de los aislados S29 y S60 con la cepa HKU10-03 (NC_014925.1).

Cuadro 2. Resultados de la identificación por PCR - RFLP de los 141 aislados identificados bioquímicamente como *Staphylococcus* sp. de piodermias caninas según año de aislamiento.

	2016	2017	2018	TOTAL
<i>S. pseudintermedius</i>	41	47	36	124
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
Otro <i>Staphylococcus</i>	9	3	5	17
Total	50	50	41	141

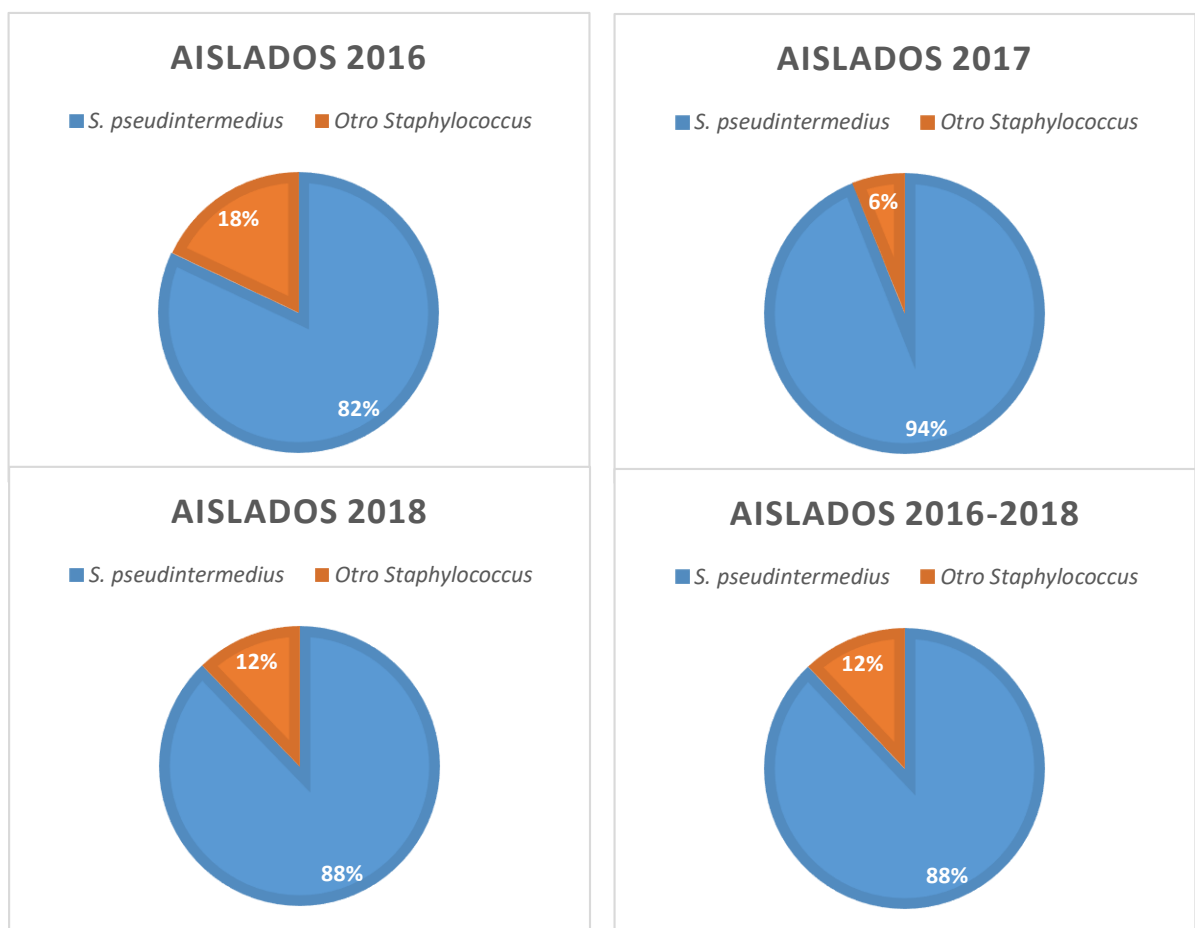


Figura 9. Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus pseudintermedius* y otros *Staphylococcus* (No *S. aureus*) por año.

V DISCUSIÓN

Alrededor del mundo la piodermia es la enfermedad de la piel de los caninos más diagnosticada, debido a que la piel canina posee ciertas características que la hacen propensa a padecer estos problemas (Gortel, 2013). El agente infeccioso más frecuente es el estafilococo, es así como la frecuencia de infecciones por *Staphylococcus* spp. en caninos es similar en diversas partes de América, así tenemos estudios realizados en Colombia donde se documenta 86% (Castellanos *et al.*, 2011), en Costa Rica 88% (Romero, 2014) y en Perú 78,3% (Antúnez *et al.*, 2009).

Bannoehr *et al.*, (2007) ha reportado que el *Staphylococcus pseudintermedius* es el agente más frecuente en piodermias caninas y no el *S. intermedius* como se creía anteriormente. Además, el contacto estrecho entre las mascotas ha hecho posible que cepas de *S. aureus* sean aisladas de animales representando de esta manera patógenos de importancia en medicina veterinaria (Devriese, 1990).

Antes de que se reportará al *S. aureus* como patógeno en perros, los *Staphylococcus* coagulasa positivo eran considerados de mínima importancia clínica en medicina veterinaria (Bond y Loeffler, 2012). Con el tiempo, los laboratorios fueron tomando en cuenta estos aislados y se les diferenció en especies distintas, siendo el *S. pseudintermedius* el principal patógeno en piodermias caninas; además de poseer un potencial zoonótico (Bond y Loeffler, 2012). Sin embargo, el principal reto fue la diferenciación de *S. pseudintermedius* de las demás especies del grupo de los *Staphylococcus intermedius*, la cual pasó por diferentes técnicas moleculares como Hibridación DNA-DNA, el análisis de secuencias multilocus y PCR-RFLP (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007; Bannoehr *et al.*, 2009). Esta última, fue la técnica la empleada para el presente estudio por ser más rápida, sencilla y económica que las anteriores mencionadas.

Por todo ello, el presente estudio tuvo como objetivo detectar *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*, mediante PCR-RFLP, aislados de piodermias caninas. Para lo cual se evaluó 141 *Staphylococcus* spp. aislados durante los años 2016-2018 mediante PCR-RFLP.

Los resultados evidencian que el 87.9 % de los aislados pertenecen a la especie de *Staphylococcus pseudintermedius*, mientras que ninguno se identificó como *Staphylococcus aureus*, y finalmente el 12.1% restante se identificó como *Staphylococcus* sp. distintos a los antes mencionados.

En cuanto al *Staphylococcus pseudintermedius*, los resultados muestran ser similares a otros estudios realizados en diferentes partes del mundo, es así que Wang *et al.* (2012) registra una frecuencia de 92% de *S. pseudintermedius* de los casos clínicos de piodermia canina por estafilococos en China, mientras que en Brasil se reportó 93.3% de *S. pseudintermedius* en piodermias caninas estafilocócicas (Bourguignon *et al.*, 2016). Por otro lado, Onuma *et al.* (2011) halló una frecuencia de 76 % de *S. pseudintermedius* en caninos de Japón, siendo moderadamente inferior a los obtenidos en el presente estudio. En general, incluyendo el presente estudio, se reporta altas frecuencias de aislamiento de *S. pseudintermedius* a partir de hisopados de piodermias en caninos. Estos resultados se explican debido a que *S. pseudintermedius*, al ser el mayor colonizador de la piel de los caninos, es más probable que actúe y esté involucrado como patógeno oportunista ante la alteración de la microbiota de la piel (Rubin y Chirino-Trejo, 2011). Esta situación puede ser más frecuente aun en perros con dermatitis atópica en quienes se ha reportado tener un porcentaje mayor de *S. pseudintermedius* como parte de su microbiota (Fazakerley *et al.*, 2009).

En el caso de *Staphylococcus aureus*, los resultados muestran ser distintos a los encontrados en otros estudios, como lo reporta Katakweba *et al.* (2016) quien halló en Tanzania 11% *S. aureus* (11/100), de igual forma en Zambia se encontró el 13.6% de *S. aureus* (Jung-Ho *et al.*, 2014) y en Corea del Sur 21.1% de *S. aureus* del total de aislados (Moon *et al.*, 2012). Estos resultados distintos podrían explicarse debido a que los estudios anteriormente mencionados incluyeron, además de muestras de hisopado de lesiones

piodérmicas, hisopados de oídos, mucosa oronasal y perianal, lo cual puede haber incrementado la probabilidad de aislar *S. aureus*, a pesar de su presencia en bajos porcentajes. Además, Garbacz y Piechowicz (2013) reportaron la existencia de un porcentaje de cepas (2%) de *Staphylococcus aureus* aislados de humanos que carecen del sitio de restricción MboI, lo cual puede resultar en falsos negativos, al observar la no digestión y conservar intacto el fragmento de 320pb. Sin embargo, es un grupo muy reducido con esta característica, así mismo, las pruebas bioquímicas son de gran ayuda en la diferenciación del *S. aureus* de las especies del grupo de los *Staphylococcus intermedius*, principalmente la fermentación de manitol a las 24 horas de los aislados de *S. aureus* (Murray *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007). A pesar de que en el presente estudio no se aislaron *S. aureus* a partir de piodertrias caninas no se debe descartar al *S. aureus* como patógeno en caninos y su potencial rol como reservorio para reinfecciones en humanos (Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016).

El resto de los *Staphylococcus* sp. no identificados como *S. pseudintermedius* ni como *S. aureus* representaron el 12.1% del total de aislados evaluados, entre los cuales pueden encontrarse *Staphylococcus schleiferi* subespecies coagulans, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, y *S. epidermidis* como reporta Hariharan *et al.* (2014). Sin embargo, esto no quiere decir que sean inocuos, *S. schleiferi* subespecies coagulans se ha reportado como patógeno oportunista con resistencia a meticilina en piodertrias caninas (Kawakami *et al.*, 2010).

Finalmente, es importante recordar la importancia de la correcta identificación de la especie de *Staphylococcus* aislado de muestras clínicas; debido a que, en base a ello se emplearan diferentes puntos de corte para la interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*, así como en la predicción de resistencia a la oxacilina (Bond y Loeffler, 2012).

VI CONCLUSIONES

- El *Staphylococcus pseudintermedius* está presente en las piodermias caninas en un 87.9% (124/141) y es el agente más frecuentemente aislado.
- En el presente estudio no se detectó molecularmente *Staphylococcus aureus* a partir de piodermias caninas.

VII RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar próximos estudios de sensibilidad antimicrobiana a los *Staphylococcus pseudintermedius*; además, realizar la detección molecular de genes de resistencia a meticilina, con el fin de conocer la situación actual de este tipo de aislados resistentes en animales domesticos y el riesgo potencial a la Salud Pública.

VIII LITERATURA CITADA

1. **Antúnez O, Calle S, Morales S, Falcón N, Pinto C. 2009.** Frecuencia de patógenos aislados en casos clínicos de dermatitis bacteriana canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev Inv Vet Perú*; 20 (2): 332-338.
2. **Atalay B, Ergin F, Cekinmez M, Caner H, Altinors N. 2005.** Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochir (Wien)* 147(3): 347-348.
3. **Ballhausen B, Kriegeskorte A, Van Alen S, Jung P, Kock R, Peters G, Bischoff M, Becker K. 2017.** The pathogenicity and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398. *Vet. Microbiol.* 200 (1):39–45.
4. **Bannoehr J, Ben Zakour N, Waller A, Guardabassi L, Van Den Broek L, Thoday K, Fitzgerald J. 2007.** Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *Agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol* 189(23): 8685-8692.
5. **Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. 2009.** Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of clinical microbiology* 47(2): 469–471.
6. **Bergey DH, Whitman WB, De Vos P, Garrity GM, Jones D. 2009.** Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3, Vol. 3. New York, Springer. 1450p.

7. **Bierowiec K, Ploneczka-Janeczko K, Rypula K. 2016.** Is the colonization of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? PLOS ONE 11(5): e0156052.
8. **Bond R, Loeffler A. 2012.** What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. Journal of Small Animal Practice 53, 147–154.
9. **Boost MV, O'Donoghue MM, James A. 2008.** Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. Epidemiol infect 136(7): 953–964.
10. **Bourguignon E, Viçosa GN, Corsini CMM, Moreira AS, Nero LA, Conceição LG. 2016.** Description of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. v.68 n.2. 299-306.
11. **Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. 1992.** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J clin microbiol. 30(7): 1654-1660.
12. **Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2011.** Microbiologia Médica, de Jawetz, Melnick y Adelberg. 25ª ed. Mexico DF: McGraw-Hill. 830p.
13. **Bustos JA, Hamdan A, Gutiérrez M. 2006.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 17:287-305.
14. **Casagrande Proietti P, Bietta A, Coletti M, Marenzoni ML, Scorza Av, Passamonti F. 2012.** Insertion sequence IS256 in canine pyoderma isolates of

- Staphylococcus pseudintermedius* associated with antibiotic resistance. Vet Microbiol. 157(3-4):376-382.
15. **Castellanos I, Rodríguez G, Santos R. 2011.** Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. Rev. Med. Vet (22): 21-30.
 16. **Cavalcanti S, Coutinho S. 2005.** Identificação e perfil de sensibilidade antibacteriana de *Staphylococcus* spp. isolados da pele de cães saudáveis e com piodermite. Clín Vet 58: 60-66pp.
 17. **Chambers HF. 1997.** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10(4):781-791.
 18. **Chopra I, Roberts M. 2001.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:232-260.
 19. **Devriese L, Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. 2005.** *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol 55(4):1569-1573
 20. **Devriese LA. 1990.** Staphylococci in healthy and diseased animals. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19: 71-80.
 21. **Ettinger SJ, Feldman EC. 2007.** Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y el gato. 6ª Ed. Madrid: Elsevier. 2116p.

22. **Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. 2009.** Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol*; 20: 179–184
23. **Fitzgerald JR. 2009.** The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Vet Dermatol* 20(5-6): 490-495.
24. **Fogel F, Manzuc P. 2009.** Dermatología canina para la práctica clínica diaria. InterMédica, Argentina. 576p.
25. **Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009.** Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol* 20 (5-6), 496-501.
26. **Fraser JD, Proft T. 2008.** The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev* 225: 226-243.
27. **Futagawa-Saito K, Sugiyama T, Karube S, Sakurai N, Ba-Thein W, Fukuyasu T. 2004.** Prevalence and Characterization of Leukotoxin-Producing *Staphylococcus intermedius* in Isolates from Dogs and Pigeons. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5324-5326.
28. **Garbacz K, Żarnowska S, Piechowicz L, Haras K. 2013.** Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 4: 255-259.

29. **Garbacz K, Piechowicz L. 2013.** Phage type 187 as a separate subunit MboI restriction site within the *Staphylococcus aureus* species. Curr Microbiol. Jun;66(6):578-581.
30. **Gerstadt K, Daly JS, Mitchell M, Wessolossky M, Cheeseman SH. 1999.** Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. Clin infect Dis 29(1): 218-219.
31. **Gortel K, Campbell KL, Kakoma I, Whitem T, Schaeffer DJ, Weisiger RM. 1999.** Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. Am J Vet Res 60: 1526 – 1530.
32. **Gortel K. 2013.** Recognizing Pyoderma, More Difficult than it May Seem. Vet Clin North Am Small Anim Pract 43(1):1-18
33. **Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. 2005.** Skin diseases of the dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis. 2nd Ed. Blacwell Science, United Kingdom. 944p.
34. **Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. 2004.** Pet animals as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 54 (2):321–332.
35. **Hanselman B, Kruth S, Rousseau J, Weese S. 2009.** Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. Can vet J 50 (9): 954-958.
36. **Hariharan H, Gibson K, Peterson R, Frankie M, Matthew V, Daniels J, Martin NA, Andrews L, Paterson T, Sharma RN. 2014.** *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies coagulans from

Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs. Vet Med Inter. 850126.

37. **Harrison EM., Weinert LA, Holden MT, Welch JJ, Wilson K, Morgan FJ, Simon RH, Anette L, Amanda KB, Sharon JP, Gavin KP, Andrew SW, Julian P, Mark AH. 2014.** A shared population of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 circulates in humans and companion animals. mBio 5(3):e00985-13.
38. **Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. 2005.** Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 43: 2286–2290.
39. **Hnilica KA, Patterson AP. 2017.** Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide. 4^a ed. Missouri: Elsevier. 652p.
40. **Ihrke. 1996.** Bacterial Skin Disease in the Dog A Guide to Canine Pyoderma. Bayer AG. Leverkusen, Germany. 1-17.
41. **Iyori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Son WG, Olivry T, Sugai M, Fukuyasu T, Iwasaki T, Nishifuji K. 2011.** *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. Vet Dermatol 22: 319-326.
42. **Jung-Ho Y, Yong HP, Bernard H, Chihiro S. 2014.** Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from companion animals and environment in the

veterinary teaching hospital in Zambia, Africa Microbiol. Infec. Diseases 37 (2): 123–130.

43. **Katakweba AS, Muhairwa AP, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L, Mtambo MM, Olsen JE. 2016.** spa typing and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from healthy humans, pigs and dogs in Tanzania. J Infect Dev Ctries. 28; 10(2):143-148.
44. **Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. 2010.** Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. J. Vet. Med. Sci. 72(12): 1615–1619.
45. **Kluytmans JA, Wertheim HF. 2005.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection 33 (1): 3-8.
46. **Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. 2012.** Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. BMC evolutionary biology, 12, 171. doi:10.1186/1471-2148-12-171
47. **Lee J. 1994.** *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. J infect; 29:105.
48. **Levy SB. 2001.** Antibiotic resistance: consequences of inaction. Clin. Infect. Dis. 33(3): 124–129.
49. **Lim D, Strynadka NCL. 2002.** Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Estruct Biol 9 (11): 870-876.

50. **Lima L, Cysneiros A, Siquiera JR, Barreto H. 2001.** Caracterização de linhagens de *Staphylococcus* resistentes a drogas isoladas de infecções superficiais de cães na cidade de Natal. En: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Rio de Janeiro, Brasil. p 198.
51. **Loeffler A, Lloyd DH. 2010.** Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? Epidemiol. Infect. 138 (5): 595–605.
52. **Lyon BR, Skurray R. 1987.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. Microbiological reviews 51: 88-134.
53. **MacFaddin JF. 2003.** Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3era Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 846p.
54. **Manian FA. 2003.** Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. Clin Infect Dis. 36:26–28.
55. **Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013.** Clinical Veterinary Microbiology. 2nd Ed: Elsevier. 920p.
56. **May ER. 2006.** Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. Vet Clin North Am Small Pract 36(1): 185-202.
57. **Mccormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. 2001.** Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Ann Rev Microbiol 55: 77-104.
58. **Moon BY, Youn JH, Shin S, Hwang SY, Park YH. 2012.** Genetic and phenotypic characterization of methicillin-resistant staphylococci isolated from

veterinary hospitals in South Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 24(3):489–498.

59. **Mülhardt C. 2007.** *Molecular Biology and Genomics*. 1ed. California: Elsevier. 272p.
60. **Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Pealler MA. 2007.** *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington: ASM-PRESS. 2399p.
61. **Mutters NT, Bieber CP, Hauck C, Reiner G, Malek V, Frank U. 2016.** Comparison of livestock-associated and health care-associated MRSA genes, virulence, and resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86(4): 417–421.
62. **Noli C, Houwers D, Willemse T. 1995.** Study of the resistance patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from dogs with pyoderma. In: *Proc. 12th Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology*. Barcelona, Spain. 216p.
63. **Onuma K, Tanabe T, Sato H. 2011.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pioderma in Japan. *Vet. Dermatol.* 23(1):17-22.
64. **Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. 2010.** Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: Pathogenecity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2: 2117-2131.
65. **Pak SI, Han HR, Shimizu A. 1999.** Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *J Vet Med Sci.* 61:1013–1018.

66. **Pitchenin L, Brandão L, Rosa J, Kagueyama F, Alves A, Rocha Ícaro, Nakazato L, Dutra V. 2018.** Occurrence of toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs and other domestic and wild species. The Journal of Infection in Developing Countries, 11(12). 957-961.
67. **Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 1994.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza: Acribia. 667 p.
68. **Ralf S. 2008.** Infecciones cutáneas en perros. Argos Boletín Informativo 101(1): 50-54.
69. **Riegel P, Jesel-Morel L, Laventie B, Boisset S, Vandenesch F, Prevost G. 2011.** Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. Int J Med Microbiol. 301(3):237-239
70. **Romero MF. 2014.** Determinación preliminar de los patrones de resistencia antimicrobiana de las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. causantes de pioderma en pacientes caninos atendidos en clínicas veterinarias del Área Metropolitana. Tesis de Médico Veterinario. Univ. Nac. De Costa Rica. 64p.
71. **Rubin JE, Chirino-Trejo M. 2011.** Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. J Vet Diagn Invest; 23: 351–354.
72. **Salazar AM, Sandoval AS, Armendariz JS. 2013.** Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 1era Ed. México DF: McGraw-Hill. 338p.

73. **Sandle T. 2004. 'Gram's Stain: History and Explanation of the Fundamental Technique of Determinative Bacteriology', IST Science and Technology Journal. 54(1): 3-4.**
74. **Sasaki T, Kikuchi, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. J. Clin. Microbiol. 45(9):2770–2778.**
75. **Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J. clin. microbiol. 48(3): 765-9.**
76. **Senturk S, Özel E, Sen A. 2005. Clinical efficacy of rifampicin for treatment of canine piodermia. Acta Vet. BRNO. 74:117-122.**
77. **Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy 93: 24-41.**
78. **Tomlin J, Pead MJ, Lloyd DH, Howell S, Hartmann F, Jackson HA. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. Vet Rec. 144:60-64.**
79. **Tse H, Tsoi HW, Leung SP, Urquhart IJ, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. 2011. Complete genome sequence of the veterinary pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* strain HKU10-03, isolated in a case of canine pyoderma. J Bacteriol, 193(7), 1783–1784.**

80. **Ueno T, Ito H, Kimizuka F, Kotani H, Nakajima K. 1993.** Gene structure and expression of the MboI restriction--modification system. *Nucleic Acids Res.* 25;21(10):2309-2313.
81. **Van Duijkeren E, Box ATA, Mulder J, Wannet WJB, Fluit AC, Houwers DJ. 2003.** An infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a dog in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd.* 128: 314–315.
82. **Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, Beenhouwer H. 2006.** First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol*; 44 (12): 4609-4612.
83. **Vandenesch F, Celard M, Arpin D, Bes M, Greenland T, Etienne J. 1995.** Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* 33 (9): 2508-2510.
84. **Verstappen KM, Huijbregts L, Spaninks M, Wagenaar JA, Fluit AC, Duim B. 2017.** Development of a real-time PCR for detection of *Staphylococcus pseudintermedius* using a novel automated comparison of whole-genome sequences. *PloS one*, 12(8): e0183925.
85. **Vigo G, Giacoboni G, Galletti P, Pasterán F, Corso A. 2015.** Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius* de muestras clínicas de caninos. *Rev Argent Microbiol* 47 (3): 206-211.
86. **Wang Y, Yang J, Logue CM, Liu K, Cao X, Zhang W, Shen J, Wu C. 2012.** Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. *J Appl Microbiol.* 112(4), 623–630.

87. **Wolfe AJ. 2005.** The acetate switch. *Microbiol mol biology rev: MMBR*, 69(1), 12–50.

ANEXOS

ANEXO 1

Reactivación y extracción de ADN

I. Procedimiento

ETAPA I: Reactivación de cepas

1. Utilizar un tubo con LB o TSB (2 mL) e incubar a temperatura ambiente.
2. Dispersar con un tip estéril (100ul) o con un asa de caldo (una gota aprox.) e incubar a 37° C por 3 horas como mínimo.
3. Sembrar en TSA e incubar a 37° C por 24 horas.
4. Colocar 1500 µL de caldo LB o TSA en viales de 2 mL. Llevar los frascos de TSB y viales a la cámara de flujo.
5. Inocular la cepa e incubar a 37° C por 3 horas.

ETAPA II: Preparación del Buffer de Lisis

1. Preparar EDTA al 0.5 M y Tris-Cl a 1M
Nota: El EDTa solo se solubiliza a pH 8.0
2. Para preparar 20 mL de buffer se agrega lo siguiente
 - a. 0,4 mL de 1M Tris-Cl (concentración final de 20mM Tris-Cl en el buffer)
 - b. 0,08 mL de 0,5 M EDTA (concentración final de 2mM EDTA)
 - c. 0,24 mL de Triton X-100 (concentración final de 1.2% Triton X-100 en el buffer)completar con agua destilada.
3. La lisozima se debe agregar inmediatamente antes de usar a una alícuota del buffer, según la cantidad de muestras a extraer.

ETAPA III: Purificación de DNA genómico de Bacterias Gram negativas

1. Recolectar 2×10^9 células bacterianas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 - 2 ml por centrifugación por 10 minutos a 5000 X g. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 μ L de Buffer de lisis preparado. Incubar a 37°C por 30 minutos.
3. Añadir 200 μ L de Solución de Lisis y 20 μ L de Proteinasa K a la muestra. Mezclar bien utilizando el Vortex hasta que se obtenga una mezcla homogénea.
4. Incubar la muestra a 56° C mientras ocasionalmente se coloca en el Vortex o usar una plataforma oscilante o termomezclador hasta que las células se encuentren totalmente lisadas (~30 min).
5. Añadir 20 μ L de Solución de RNasa A, mezclar utilizando el Vortex e incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 400 μ L de etanol al 50% y mezclar pipeteando o usando el Vortex.
7. Transferir el lisado a una Columna del kit insertada en un tubo colector. Centrifugar la columna por 1 minuto a 6000 X g. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado. Coloque la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL (incluido)
8. Añadir 500 μ L de Wash Buffer I (con etanol añadido). Centrifugar por 1 minuto a 8000 X g. Descartar el filtrado y colocar la columna de purificación de regreso en el tubo colector.
9. Añadir 500 μ L de Wash Buffer II (con etanol añadido) a la columna. Centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima (≥ 1200 X g). Descarte el

tubo colector que contiene el filtrado y transferir la columna a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL (no incluido)

Opcional: Si se observa una solución residual en la columna de purificación, vacíe el tubo colector y centrifugue nuevamente por 1 minuto a máxima velocidad.

10. Añadir 100 µL de Buffer de Elución al centro de la membrana de la columna para eluir el DNA genómico. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8000 X g.

Nota:

- Para un máximo rendimiento de DNA, repetir la elución con 100 µL de Buffer de Elución adicionales.

- Si se requiere una mayor concentración de DNA o si el DNA es aislado de una pequeña cantidad de material inicial, el volumen del Buffer de Elución añadido a la columna puede ser reducido a 50-100 µL. Por favor, ser consciente de que pequeños volúmenes de Buffer de Elución resultará en pequeñas cantidades finales de DNA eluido.

11. Descartar la columna de purificación. Usar el DNA purificado inmediatamente o almacenar a - 20° C

ANEXO 2

Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2016

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ADN (ng/uL)	ESPECIE
1	G + 41	27.630	<i>S. pseudintermedius</i>
2	G + 42	28.522	<i>S. pseudintermedius</i>
3	G + 43	45.200	<i>S. pseudintermedius</i>
4	G + 44	16.320	<i>S. pseudintermedius</i>
5	G + 45	51.976	<i>S. pseudintermedius</i>
6	G + 46	40.343	<i>S. pseudintermedius</i>
7	G + 47	36.492	<i>S. pseudintermedius</i>
8	G + 49	52.701	<i>S. pseudintermedius</i>
9	G + 50	66.402	<i>S. pseudintermedius</i>
10	G + 51	58.179	Otro <i>Staphylococcus</i>
11	G + 52	22.056	<i>S. pseudintermedius</i>
12	G + 54	23.440	Otro <i>Staphylococcus</i>
13	G + 56	25.527	<i>S. pseudintermedius</i>
14	G + 57	43.260	<i>S. pseudintermedius</i>
15	G + 59	43.628	<i>S. pseudintermedius</i>
16	G + 62	45.651	<i>S. pseudintermedius</i>
17	G + 63	34.975	Otro <i>Staphylococcus</i>
18	G + 64	34.986	<i>S. pseudintermedius</i>
19	G + 65	90.880	<i>S. pseudintermedius</i>
20	G + 66	26.405	<i>S. pseudintermedius</i>
21	G + 68	28.975	<i>S. pseudintermedius</i>
22	G + 69	31.821	<i>S. pseudintermedius</i>
23	G + 73	51.708	<i>S. pseudintermedius</i>
24	G + 75 II	18.794	<i>S. pseudintermedius</i>
25	G + 77	61.603	<i>S. pseudintermedius</i>
26	G + 78	48.853	<i>S. pseudintermedius</i>
27	G + 79	82.464	<i>S. pseudintermedius</i>
28	G + 80	58.933	<i>S. pseudintermedius</i>
29	G + 83	68.372	Otro <i>Staphylococcus</i>
30	G + 84	57.945	<i>S. pseudintermedius</i>
31	G + 85	23.023	<i>S. pseudintermedius</i>
32	G + 86	52.755	Otro <i>Staphylococcus</i>
33	G + 89	56.008	Otro <i>Staphylococcus</i>
34	G + 92	43.111	Otro <i>Staphylococcus</i>
35	G + 93	33.806	<i>S. pseudintermedius</i>
36	G + 94	147.863	<i>S. pseudintermedius</i>
37	G + 95	128.974	<i>S. pseudintermedius</i>
38	G + 96	34.517	<i>S. pseudintermedius</i>
39	G + 97	59.799	<i>S. pseudintermedius</i>
40	G + 98	69.255	<i>S. pseudintermedius</i>
41	G + 99	99.274	<i>S. pseudintermedius</i>
42	G + 106	55.424	<i>S. pseudintermedius</i>
43	G + 107	78.239	<i>S. pseudintermedius</i>
44	G + 108	21.558	<i>S. pseudintermedius</i>
45	G + 110	69.215	<i>S. pseudintermedius</i>
46	G + 111	19.412	Otro <i>Staphylococcus</i>
47	G + 112	49.086	Otro <i>Staphylococcus</i>
48	G + 114	43.230	<i>S. pseudintermedius</i>
49	G + 115	53.319	<i>S. pseudintermedius</i>
50	G + 116	33.252	<i>S. pseudintermedius</i>

ANEXO 3

Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2017

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ADN (ng/uL)	ESPECIE
1	RM1	16.503	<i>S. pseudintermedius</i>
2	RM2	11.583	<i>S. pseudintermedius</i>
3	RM3	12.070	<i>S. pseudintermedius</i>
4	RM4	23.410	<i>S. pseudintermedius</i>
5	RM6	26.444	<i>S. pseudintermedius</i>
6	S8	13.198	<i>S. pseudintermedius</i>
7	S9	6.334	<i>S. pseudintermedius</i>
8	S10	28.879	<i>S. pseudintermedius</i>
9	S13	29.121	<i>S. pseudintermedius</i>
10	S15	12.212	<i>S. pseudintermedius</i>
11	S17	50.597	<i>S. pseudintermedius</i>
12	S18	42.196	<i>S. pseudintermedius</i>
13	S19	40.068	<i>S. pseudintermedius</i>
14	S21	40.827	<i>S. pseudintermedius</i>
15	S23	38.698	<i>S. pseudintermedius</i>
16	S24	32.399	<i>S. pseudintermedius</i>
17	S27	17.218	Otro Staphylococcus
18	S28	92.914	<i>S. pseudintermedius</i>
19	S29	117.190	<i>S. pseudintermedius</i>
20	S30	14.381	<i>S. pseudintermedius</i>
21	S31	70.050	<i>S. pseudintermedius</i>
22	S32	27.755	<i>S. pseudintermedius</i>
23	S33	53.787	<i>S. pseudintermedius</i>
24	S34	46.784	<i>S. pseudintermedius</i>
25	S36	16.686	<i>S. pseudintermedius</i>
26	S37	85.426	<i>S. pseudintermedius</i>
27	S38	46.665	<i>S. pseudintermedius</i>
28	S39	43.966	<i>S. pseudintermedius</i>
29	S40	39.311	<i>S. pseudintermedius</i>
30	S41	19.327	<i>S. pseudintermedius</i>
31	S42	47.196	<i>S. pseudintermedius</i>
32	S43	72.626	<i>S. pseudintermedius</i>
33	S44	54.295	<i>S. pseudintermedius</i>
34	S45	56.732	<i>S. pseudintermedius</i>
35	S46	27.047	<i>S. pseudintermedius</i>
36	S47	62.556	<i>S. pseudintermedius</i>
37	S48	11.443	<i>S. pseudintermedius</i>
38	S49	21.203	<i>S. pseudintermedius</i>
39	S50	17.009	<i>S. pseudintermedius</i>
40	S51	43.194	<i>S. pseudintermedius</i>
41	S52	45.707	Otro Staphylococcus
42	S53	60.485	<i>S. pseudintermedius</i>
43	S54	23.608	<i>S. pseudintermedius</i>
44	S55	32.311	<i>S. pseudintermedius</i>
45	S56	46.424	Otro Staphylococcus
46	S57	24.595	<i>S. pseudintermedius</i>
47	S58	45.450	<i>S. pseudintermedius</i>
48	S60	88.711	<i>S. pseudintermedius</i>
49	S61	55.692	<i>S. pseudintermedius</i>
50	S63	32.834	<i>S. pseudintermedius</i>

ANEXO 4

Resultados de la identificación por PCR – RFLP y concentración de ADN de los aislados del año 2018

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ADN (ng/uL)	ESPECIE
1	ST-1	70.080	Otro Staphylococcus
2	ST-2	69.213	<i>S. pseudintermedius</i>
3	ST-3	74.939	<i>S. pseudintermedius</i>
4	ST-4	25.022	<i>S. pseudintermedius</i>
5	ST-5	63.008	<i>S. pseudintermedius</i>
6	ST-6	112.243	<i>S. pseudintermedius</i>
7	ST-8	70.421	<i>S. pseudintermedius</i>
8	ST-9	60.361	<i>S. pseudintermedius</i>
9	ST-10	83.624	<i>S. pseudintermedius</i>
10	ST-11	72.302	<i>S. pseudintermedius</i>
11	ST-14	38.120	<i>S. pseudintermedius</i>
12	ST-15	41.820	<i>S. pseudintermedius</i>
13	ST-16	30.158	<i>S. pseudintermedius</i>
14	ST-15(1)	20.230	<i>S. pseudintermedius</i>
15	ST-16(1)	68.581	<i>S. pseudintermedius</i>
16	ST-17	34.141	<i>S. pseudintermedius</i>
17	ST-19	61.764	Otro Staphylococcus
18	ST-20	10.965	<i>S. pseudintermedius</i>
19	ST-21	50.577	<i>S. pseudintermedius</i>
20	ST-22	62.151	<i>S. pseudintermedius</i>
21	ST-23	20.625	<i>S. pseudintermedius</i>
22	ST-24	25.411	<i>S. pseudintermedius</i>
23	ST-25	19.666	<i>S. pseudintermedius</i>
24	ST-26	23.709	<i>S. pseudintermedius</i>
25	ST-27	99.168	<i>S. pseudintermedius</i>
26	ST-28	83.364	<i>S. pseudintermedius</i>
27	ST-29	21.697	<i>S. pseudintermedius</i>
28	ST-30	35.541	<i>S. pseudintermedius</i>
29	ST-31	20.294	<i>S. pseudintermedius</i>
30	ST-32	42.712	<i>S. pseudintermedius</i>
31	ST-33	23.079	<i>S. pseudintermedius</i>
32	ST-34	73.040	<i>S. pseudintermedius</i>
33	ST-37	99.550	<i>S. pseudintermedius</i>
34	ST-38	94.767	<i>S. pseudintermedius</i>
35	ST-39	84.957	Otro Staphylococcus
36	ST-40	128.339	<i>S. pseudintermedius</i>
37	ST-41	95.599	<i>S. pseudintermedius</i>
38	ST-42	83.944	<i>S. pseudintermedius</i>
39	ST-43	54.702	Otro Staphylococcus
40	ST-44	75.501	<i>S. pseudintermedius</i>
41	ST-45	27.964	Otro Staphylococcus